

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Sav Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	<input type="button" value="Print/Save Selected"/>	<input type="button" value="Send Results"/>	<input type="button" value="Display Selected"/> Format	Fre	<input type="checkbox"/>
--	---	--	---	--	-----	--------------------------

1.  3/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

012451578

WPI Acc No: 1999-257686/199922

XRAM Acc No: C99-075705

Reactivation of immobilized lipase for trans-esterification  
- comprises processing immobilized lipase liquid consisting of  
phospholipid, polar and non-polar solvents

Patent Assignee: ASAHI DENKA KOGYO KK (ASAE )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 11075834	A	19990323	JP 97250959	A	19970916	199922 B

Priority Applications (No Type Date): JP 97250959 A 19970916

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

JP 11075834 A 4 C12N-009/20

Abstract (Basic): JP 11075834 A

NOVELTY - Immobilized lipase having reduced activity is reactivated by processing with liquid containing polar solvent, non-polar solvent and phospholipid.

USE - Used in transesterification (claimed).

ADVANTAGE - Transesterification is performed efficiently. The reactivation of immobilized lipase reduces the moisture content and formation of by-product (water).

Dwg. 0/0

Title Terms: REACTIVATION; LIPASE; TRANS; ESTERIFICATION; COMPRISE; PROCESS ; LIPASE; LIQUID; CONSIST; PHOSPHOLIPID; POLE; NON; POLE; SOLVENT

Derwent Class: D16; D23

International Patent Class (Main): C12N-009/20

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	<input type="button" value="Print/Save Selected"/>	<input type="button" value="Send Results"/>	<input type="button" value="Display Selected"/> Format	Free	<input type="checkbox"/>
--	---	--	---	--	------	--------------------------

© 2003 Dialog, a Thomson business

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-75834

(43)公開日 平成11年(1999)3月23日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>

C 1 2 N 9/20

識別記号

F I

C 1 2 N 9/20

審査請求 未請求 請求項の数2 O.L (全4頁)

(21)出願番号

特願平9-250959

(22)出願日

平成9年(1997)9月16日

(71)出願人 000000387

旭電化工業株式会社

東京都荒川区東尾久7丁目2番35号

(72)発明者 小堀 僕

東京都荒川区東尾久7丁目2番35号 旭電  
化工業株式会社内

(72)発明者 荒川 浩

東京都荒川区東尾久7丁目2番35号 旭電  
化工業株式会社内

(72)発明者 廣川 敏幸

東京都荒川区東尾久7丁目2番35号 旭電  
化工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 羽鳥 修

(54)【発明の名称】 固定化リバーゼの再活性化方法

(57)【要約】

【課題】 エステル交換反応に用いた固定化リバーゼの再活性化、特に副生物が極力生じないように水分含量を低くした油脂を基質とするエステル交換反応に用いた固定化リバーゼの再活性化に適用しても、該固定化リバーゼの再活性化を効率よく行うことができ、且つ工業的規模で該再活性化処理が行いやすい、固定化リバーゼの再活性化方法の提供。

【解決手段】 エステル交換反応に用いて活性が低下した固定化リバーゼを、非極性溶剤と極性溶剤とリン脂質とからなる処理液で処理する。

1

**【特許請求の範囲】**

**【請求項 1】** エステル交換反応に用いて活性が低下した固定化リバーゼを、非極性溶剤と極性溶剤とリン脂質とからなる処理液で処理することを特徴とする固定化リバーゼの再活性化方法。

**【請求項 2】** 上記処理液が、非極性溶剤 100 重量部に対して、極性溶剤 0.1 ~ 20 重量部及びリン脂質 0.5 ~ 10 重量部を含有するものである請求項 1 記載の固定化リバーゼの再活性化方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

**【発明の属する技術分野】** 本発明は、エステル交換反応に用いて活性が低下した固定化リバーゼの再活性化方法に関するものである。

**【0002】**

**【従来の技術】** 油脂類のエステル交換は、工業的には水酸化ナトリウムやソジウムメチラートを用いた化学的エステル交換が広く行われている。しかし、化学的エステル交換では、大量の強アルカリの廃水が生成し、廃水処理が問題となっている。近年、化学的エステル交換に代わる技術としてリバーゼを用いたエステル交換技術の研究が盛んに行われている。リバーゼを用いたエステル交換では廃水の問題が解消され、反応温度も低くできることから、環境にやさしい技術といえる。しかし、リバーゼを用いたエステル交換は、一部で工業化も試みられているものの、リバーゼのコストが高いことから、実用化が困難な状況にある。リバーゼコストを下げる試みとして、単位酵素あたりの油脂処理量を向上させることが種々検討されている。また、エステル交換反応に使用して活性の低下したリバーゼを再生して繰り返し利用しようとする提案も数多くなされている。

**【0003】** 例えば、特開昭 61-149084 号公報には、リバーゼを水あるいは低級アルコールを用いて湿润処理することによりリバーゼを再活性化する方法が記載されている。また、特開平 5-137574 号公報には、固定化リバーゼを非極性溶剤及び極性溶剤で処理することにより固定化リバーゼを再活性化する方法が記載されている。

**【0004】**

**【発明が解決しようとする課題】** しかし、特開昭 61-149084 号公報に記載の方法は、複雑な操作が必要であるため、手間がかかり、工業的には困難である。また、特開平 5-137574 号公報に記載の方法は、水分含量の少ない基質のエ斯特ル交換反応に用いた固定化リバーゼの再活性化に適用すると、再活性化の程度が低いという欠点を有するものである。

**【0005】** 従って、本発明の目的は、エ斯特ル交換反応に用いた固定化リバーゼの再活性化、特に副生物が極力生じないように水分含量を低くした油脂を基質とするエ斯特ル交換反応に用いた固定化リバーゼの再活性化に

2

適用しても、該固定化リバーゼの再活性化を効率よく行うことができ、且つ工業的規模で該再活性化処理が行いやすい、固定化リバーゼの再活性化方法を提供することにある。

**【0006】**

**【課題を解決するための手段】** 本発明は、エ斯特ル交換反応に用いて活性が低下した固定化リバーゼを、非極性溶剤と極性溶剤とリン脂質とからなる処理液で処理することを特徴とする固定化リバーゼの再活性化方法を提供することにより、上記目的を達成したものである。

**【0007】**

**【発明の実施の形態】** 以下に本発明の固定化リバーゼの再活性化方法について詳述する。本発明におけるエ斯特ル交換反応とは、油脂と油脂とのエ斯特ル交換反応、油脂と脂肪酸とのエ斯特ル交換反応、及び油脂と脂肪酸エ斯特ルとのエ斯特ル交換反応が挙げられる。斯るエ斯特ル交換反応に用いられる油脂としては、大豆油、なたね油、米油、コーン油、綿実油、パーム油、パーム核油、ヤシ油、カカオ脂、サル脂、魚油、ラード、牛脂、乳脂等の動植物油脂及びこれらの分別油、硬化油やトリラウリン、トリオレイン、トリパルミチン等の合成油脂等がある。脂肪酸としては、ステアリン酸、パルミチン酸、ラウリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸等がある。脂肪酸エ斯特ルとしては、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸等の脂肪酸と、メタノール、エタノール、ブタノールやプロパンノールとを反応させることにより得られもの、例えばステアリン酸エチル、パルミチン酸メチル、オレイン酸ブチル、リノール酸プロピル等がある。

**【0008】** 本発明の再活性化の対象とされる固定化リバーゼに用いられるリバーゼとしては、特に制限はなく、植物種子、ブタ臍臚、微生物、カビ、酵母等に由来するものが挙げられ、また位置特異性リバーゼでも位置特異性のないリバーゼのどちらでもよい。また、該リバーゼを固定化する固定化担体としては、イオン交換樹脂、セラミック、ケイソウ土、セライト、キチン、キトサン、活性炭、シリカゲル等が挙げられる。

**【0009】** 本発明で用いられる処理液に含有される非極性溶剤としては、石油エーテル、ジエチルエーテル、ヘキサン、ペンタン、ヘプタン、イソオクタン、酢酸エチル等の中から 1 種または 2 種以上を用いることができ、その中ではヘキサンが好ましい。また、上記処理液に含有される極性溶剤としては、メタノール、エタノール、ブロパンノール、ブタノール、アセトン、メチルエチルケトン等の中から 1 種または 2 種以上を用いることができ、その中ではエタノール及び/またはアセトンが好ましい。また、上記処理液に含有されるリン脂質としては、卵黄レシチン及び/または大豆レシチン等が挙げられるが、コスト及び効果を考慮すると大豆レシチンが好ましい。

【0010】本発明で用いられる処理液中の上記非極性溶剤と上記極性溶剤と上記リン脂質との比率は、非極性溶剤100重量部に対して、極性溶剤が好ましくは0.1～20重量部、より好ましくは0.2～15重量部、特に好ましくは0.2～7重量部であり、リン脂質が好ましくは0.5～10重量部、より好ましくは2～10重量部、特に好ましくは2～6重量部である。極性溶剤が0.1重量部より少ないとリン脂質がうまく分散しないことがあり、20重量部より多いとリバーゼの再活性化を阻害することがある。また、リン脂質が0.5重量部より少ないとリバーゼの再活性化を十分に行えないことがあり、10重量部より多いとリン脂質がうまく分散しないことがある。なお、大豆レシチンには一般に30～50重量%の大豆油が含まれており、リン脂質として大豆レシチンを使用する場合は、大豆油を除いた重量がリン脂質の重量に相当する。

【0011】特に、極性溶剤としてエタノールを用いる場合は、非極性溶剤100重量部に対して、エタノールを好ましくは0.1～10重量部、より好ましくは0.2～5重量部、特に好ましくは0.2～2重量部用いるとよい。エタノールが0.1重量部よりも少ないとリン脂質がうまく分散しないことがあり、10重量部よりも多いとリバーゼの再活性化を阻害することがある。また、極性溶剤としてアセトンを用いる場合は、非極性溶剤100重量部に対して、アセトンを好ましくは1～20重量部、より好ましくは3～15重量部、特に好ましくは3～7重量部用いるとよい。アセトンが1重量部よりも少ないとリン脂質がうまく分散しないことがあり、20重量部よりも多いとリバーゼの再活性化を阻害することがある。

【0012】固定化リバーゼを上記処理液で処理する方法としては、固定化リバーゼに上記処理液を混合・攪拌後、ろ過して残渣を乾燥させるバッチ法と、固定化リバーゼを充填したカラムに上記処理液を通し、固定化リバーゼを乾燥させるカラム法が挙げられ、いずれの方法でも良い。バッチ法の場合、処理液と固定化リバーゼの比率は、処理液中の非極性溶剤100重量部に対して、固定化リバーゼ100重量部以下が良く、処理効率を考慮すると固定化リバーゼ20～100重量部が好ましい。カラム法の場合ではカラムの形状、処理液の配合、流速等によって固定化リバーゼと処理液の比率は変化するが、非極性溶剤100重量部に対して固定化リバーゼ1～50重量部が好ましい。再活性化に使用した処理液は、繰り返し使用することもできる。

### 【0013】

【実施例】以下、実施例を比較例と共に挙げて、本発明を更に詳しく説明するが、本発明は、これらの実施例に制限されるものではない。

### 【0014】実施例1

ノボノルディスク社製の固定化リバーゼ（リポザイム I

M）20gを空カラムに充填して30℃に保温し、これに綿実油（水分量100ppm）を20g/hの流速で通液してエステル交換反応を行った。反応30日目のリバーゼ活性を調べたところ、初期活性の18%に低下していた。このリバーゼ活性の低下した固定化リバーゼを抜き出し、その内の5gに、ヘキサン5g、エタノール0.02g及び大豆油を40%含有している大豆ペーストレシチン0.4g（リン脂質として0.24g）からなる処理液を加え、室温で1日間、再活性化処理を行ったところ、リバーゼ活性は初期活性の61%まで回復した。なお、リバーゼ活性の測定は、トリミリストン1.0重量部とトリオレイン9.0重量部を混合し、固定化リバーゼを対油1重量%添加して、反応温度55℃、振とう数120ストローク/m in、振幅2.5cm、反応時間1時間でエステル交換反応を行い、トリミリストンの減少速度からリバーゼ活性を求める方法により行った。以降、単にリバーゼ活性と記した場合は本方法によるものとする。

### 【0015】比較例1

20 実施例1のエステル交換反応30日目の固定化リバーゼ5gに、実施例1の処理液から大豆ペーストレシチンを除いた配合の処理液、すなわちヘキサン5g及びエタノール0.02gからなる処理液を加えた他は、実施例1と同様の方法で再活性化処理した。処理された固定化リバーゼは、リバーゼ活性が初期活性の29%までしか回復しなかった。

### 【0016】比較例2

30 実施例1のエステル交換反応30日目の固定化リバーゼ5gに、実施例1の処理液からエタノールを除いた配合の処理液、すなわちヘキサン5g及び大豆油を40%含有している大豆ペーストレシチン0.4g（リン脂質として0.24g）からなる処理液を加えた他は、実施例1と同様の方法で再活性化処理した。処理された固定化リバーゼは、リバーゼ活性が初期活性の24%までしか回復しなかった。

### 【0017】実施例2

名糖産業（株）製の固定化リバーゼ（リバーゼPLC）3kgを空カラムに充填して55℃に保温し、これにパーム油（水分量80ppm）を750g/hの流速で通液してエステル交換反応を行った。反応12日目のリバーゼ活性を調べたところ、初期活性の7%に低下していた。このリバーゼ活性の低下した固定化リバーゼを抜き出して3等分し、それぞれを空カラムに再充填した。そのうちの1つにヘキサン100重量部、アセトン5重量部及び大豆油を40%含有している大豆ペーストレシチン1重量部（リン脂質として0.6重量部）からなる処理液を250g/hの流速で合計5kgを通液した。通液後、カラムから固定化リバーゼを抜き出し、室温で乾燥してからリバーゼ活性を測定したところ、リバーゼ活性は初期活性の45%まで回復した。

## 【0018】比較例3

実施例2のエステル交換反応12日目の固定化リバーゼを再充填したカラムの1つに、実施例2の処理液から大豆ペーストレシチンを除いた配合の処理液、すなわちヘキサン100重量部及びアセトン5重量部からなる処理液を通液した他は、実施例2と同様の方法で再活性化処理した。処理された固定化リバーゼは、リバーゼ活性が初期活性の11%までしか回復しなかった。

## 【0019】比較例4

実施例2のエステル交換反応12日目の固定化リバーゼを再充填したカラムの1つに、実施例2の処理液からアセトンを除いた配合の処理液、すなわちヘキサン100重量部及び大豆油を40%含有している大豆ペーストレシチン1重量部（リン脂質として0.6重量部）からなる処理液を通液した他は、実施例2と同様の方法で再活性化処理した。処理された固定化リバーゼは、リバーゼ活性が初期活性の12%までしか回復しなかった。

## 【0020】実施例3

ナタネ部分水添油（融点36℃）100重量部と大豆油100重量部の混合油（水分量110ppm）700kgにノボノルディスク社製の固定化リバーゼ（ノボザイム435）35kgを添加し、反応温度50℃、攪拌羽根の回転数12rpmにより48時間、エステル交換反応を行った。反応後、反応液をろ過し、固定化リバーゼを分別し、この固定化リバーゼを使用して同様の反応をさらに2回繰り返した。反応後の固定化リバーゼのリバーゼ活性を調べたところ、初期活性の40%に低下していた。このリバーゼ活性の低下した固定化リバーゼ10kgをヘキサン100重量部、アセトン5重量部及び大豆油を40%含有している大豆ペーストレシチン15重

量部（リン脂質として9重量部）からなる処理液10kgに加え、処理温度40℃、攪拌羽根の回転数8rpmにより16時間、再活性化処理を行ったところ、リバーゼ活性は初期活性の89%まで回復した。

## 【0021】比較例5

実施例3のエステル交換反応後の固定化リバーゼを、実施例3の処理液から大豆ペーストレシチンを除いた配合の処理液、すなわちヘキサン100重量部及びアセトン5重量部からなる処理液に加えた他は、実施例3と同様の方法で再活性化処理した。処理された固定化リバーゼは、リバーゼ活性が初期活性の54%までしか回復しなかった。

## 【0022】比較例6

実施例3のエステル交換反応後の固定化リバーゼを、実施例3の処理液からアセトンを除いた配合の処理液、すなわちヘキサン100重量部及び大豆油を40%含有している大豆ペーストレシチン15重量部（リン脂質として9重量部）からなる処理液に加えた他は、実施例3と同様の方法で再活性化処理した。処理された固定化リバーゼは、リバーゼ活性が初期活性の57%までしか回復しなかった。

## 【0023】

【発明の効果】本発明の固定化リバーゼの再活性化方法によれば、エステル交換反応に用いた固定化リバーゼの再活性化、特に副生物が極力生じないように水分含量を低くした油脂を基質とするエステル交換反応に用いた固定化リバーゼの再活性化に適用しても、該固定化リバーゼの再活性化を効率よく行うことができ、且つ工業的規模で該再活性化処理が行いやすい。